

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18642

研究課題名（和文）慢性子宮内膜炎モデルの確立とテロサイトの病態への関与の解析

研究課題名（英文）Establishment of chronic endometritis model and analysis of Terocytes involvement

研究代表者

三宅 達也（Miyake, Tatsuya）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00814766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では慢性子宮内膜炎モデルを新規作製し、子宮内膜炎が子宮内膜および子宮筋層に存在するテロサイトに及ぼす影響を検討することを目的とした。LPS子宮腔内投与により子宮内膜間質に形質細胞を誘導し、着床率・流産率などを検討した。本研究期間内に十分な結果を得ることができなかったため、現在も進行中であるが、近日中に結果が得られる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「慢性的な」炎症による病的な状態が女性生殖器におけるテロサイトに与える影響に関する評価は未だ十分にされていない。これまでに慢性子宮内膜炎症例での子宮に存在するテロサイトの発現を確認した検討はなく、今回我々は子宮内膜炎が子宮に存在するテロサイトに及ぼす影響に関して検討することを目的とする。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated a new model of chronic endometritis to investigate the effects of endometritis on terocytes in the endometrium and myometrium, induced plasmacytoid cells in the endometrial stroma by intracavitary administration of LPS, and investigated implantation and miscarriage rates. Since we were not able to obtain sufficient results within the time frame of this study, we are still in the process of conducting this study, and the results will be available in the near future.

研究分野：生殖医学

キーワード：慢性子宮内膜炎 着床 生殖医学 不妊症 LPS テロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

子宮および卵管において十分に制御された収縮及び蠕動運動は様々な生殖機能を果たす上で非常に重要であり、月経血を排出し、精子を輸送し、受精卵を適切な着床部位に輸送し、妊娠中は子宮容積を増大し、適切な時期に分娩するなど、生命活動を維持する上で欠かせない現象である。テロサイト(Telocytes:TCs)は2005年 L.M. Popescu らのグループによって膵臓・心筋・女性生殖器・胎盤など正常臓器の間質に存在する新しい種類の細胞として発見され(J Cell Mol Med. 2005;9:476-477)、腸管ペースメーカー細胞であるカハールの介在細胞と類似した機能・形態を呈することから Interstitial Cajal-like Cells(ICLSs)として知られるようになった。その後、機能的および形態学的に ICCs とは一部異なることが報告され、2010年“Telocytes”と呼ばれている(J Cell Mol Med.2010;14:729-40)。女性生殖器にも発現することがわかっており、子宮筋層の収縮・妊娠維持・免疫調節や組織再生などに関与する可能性が示唆されている。着床時期における子宮内膜はダイナミックにその機能および構造が変化し、経時的に多数の物質が関与する多段階反応である。妊娠成立のためには良好な胚と子宮内膜の着床環境が最も重要な因子である。着床に必要な子宮内膜の変化は、子宮内膜 NK 細胞などの子宮内膜免疫細胞の子宮内膜への侵入 子宮内膜間質細胞の脱落膜化 子宮内膜の血管構築、などが重要である。テロサイトはマクロファージ・脂肪細胞・リンパ球などの免疫細胞とネットワークを形成することが知られている(J. Cell. Mol.Med.2012; 16: 3001-3008.)。テロサイトは非妊時増殖期に比し非妊時黄体期や妊娠中の子宮内膜間質に多く存在しており、Connexin 43 を発現している。Connexin 43 (Cx43)は子宮内膜の脱落膜化に重要な役割を果たし、Connexin43 ノックアウトマウスでは着床障害および VEGF などの血管増生因子の発現が低下する(Development. 2008 Aug;135(15):2659-68)。これらより、テロサイトは着床に必要な子宮内膜の形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

慢性子宮内膜炎(chronic endometritis:CE)は、不妊症の原因となり着床障害を来することが近年注目されている。子宮内膜炎には急性と慢性が存在するが、急性子宮内膜炎は子宮内膜機能層が感染の首座であり、一方、慢性子宮内膜炎は子宮内膜基底層における持続的な感染が主な病態である。慢性子宮内膜炎は子宮内膜間質に形質細胞(CD138 陽性細胞)が浸潤していることで診断される。一般不妊患者の約30%に、着床障害や不育症患者の約60%に認め、未治療群に比し抗生剤治療群では体外受精による妊娠率および生児獲得率が有意に上昇する(Hum Reprod 2015; 30: 323)。慢性子宮内膜炎症例では生理的な子宮収縮パターンと逆方向の収縮が多く観察され着床時期に不規則な子宮収縮運動が起こることが報告されている(Fertil Steril 2015; 103: 1049)。子宮および卵管において十分に制御された収縮及び蠕動運動は様々な生殖機能を果たす上で非常に重要であり、月経血を排出し、精子を輸送し、受精卵を適切な着床部位に輸送し、妊娠中は子宮容積を増大し、適切な時期に分娩するなど、生命活動を維持する上で欠かせない現象である。

以上より、「持続的な子宮内膜の炎症が子宮内膜および子宮筋層に波及しテロサイトが減少することにより、着床環境の悪化および子宮の不全蠕動をひきおこしている」ことが予想され、慢性子宮内膜炎とテロサイトの発現を検討することが病態の解明に寄与するであろうという着想に至った。

## 2. 研究の目的

「慢性的な」炎症による病的な状態が女性生殖器におけるテロサイトに与える影響に関する評価は未だ十分になされていない。これまでに慢性子宮内膜炎症例での子宮に存在するテロサイトの発現を確認した検討はなく、今回我々は子宮内膜炎が子宮に存在するテロサイトに及ぼす影響に関して検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

慢性子宮内膜炎モデルを新規作製し、子宮内膜炎が子宮内膜および子宮筋層に存在するテロサイトに及ぼす影響を検討する。

### (A) 子宮内膜炎モデルマウスの作成

6-9週齢のC57BL/6マウスを 子宮内LPS投与 1日経過群 子宮内LPS投与 7日経過群 腹腔内LPS投与 7日経過群 saline群、の4群に振り分け、全身麻酔下に開腹しE.coli由来の10 $\mu$ LのLPS(1mg/mL)を両側子宮角もしくは腹腔内に投与する。投与後 1日目もしくは7日目の時点で子宮を摘出し、HE染色により子宮内膜及び筋層の形態学的評価を行う。さらに免疫染色を用いてCD138陽性細胞(形質細胞)の子宮内膜間質への浸潤の評価を行う。慢性子宮内膜炎を「HE染色で内膜間質に急性炎症の像がなく、免疫染色で内膜間質にCD138陽性細胞が存在する」と定義し、これを満たす群を慢性子宮内膜炎モデルマウスとして、以下の実験に供する。

(B) 子宮内膜炎モデルマウスに関する着床数や流産数などに関する検討

(A) で作成したモデルマウスに対し、交配を行い、着床数・流産数などを検討する。

(C) 子宮内膜炎モデルマウスにおける子宮テロサイトの発現比較および評価

(A) で作成した慢性子宮内膜炎モデルマウスの子宮内膜および子宮筋層に存在するテロサイトの発現量を確認する。子宮におけるテロサイトは免疫染色にて CD43 染色されることでその存在を証明する。さらに T 細胞 (CD4, CD8)、脂肪細胞 (Perilipin 抗体)、NK 細胞 (CD56) との二重免疫染色および In situ hybridization を行い、周囲の免疫細胞の局在およびその関係性を評価する。

#### 4. 研究成果

(A) C3H/HeN および C57BL/6J マウスの子宮内膜間質における CD138 陽性細胞 (形質細胞) の発現を確認した。C3H/HeN マウスはコントロール群 (saline 投与群) にも多数の CD138 陽性細胞を認め個体差も大きく、LPS 投与による CD138 陽性細胞の発現の増加は認めなかった。本研究では C57BL/6J マウスを用いることとした。

腹腔内および子宮腔内に LPS 10  $\mu$ g の投与を行い子宮内膜間質に誘導される CD138 陽性細胞数を比較検討すると、子宮腔内投与群でより多くの CD138 陽性細胞の発現を認めた。コントロール群 (PBS 投与群 2.7 $\pm$ 2.2 個) に比し、LPS 10  $\mu$ g 子宮内投与群、TNP-LPS 10  $\mu$ g 子宮内投与群では 8.2 $\pm$ 7.4 個 (n=6)、9.9 $\pm$ 9.1 個 (n=6) と、形質細胞数の増加傾向を認めた。LPS 投与により子宮内膜間質に形質細胞を誘導されることが確認された。

(B)(C) 9 週齢の C57BL/6J マウスの子宮腔内に LPS50  $\mu$ g を投与し、投与後 7 日目以降で交配を行い、その着床数や流産数を検討した。本モデルでは着床数は低下しなかったが、流産数の増加を認めた。施設移転に伴う環境変化などの影響もありモデルマウス作成の条件設定に時間を要し、本研究期間内に十分な結果を得ることができなかつたため、現在も研究を継続している。近日中に結果が得られる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 風太、瀧内 剛、伴田 美佳、高橋 直子、神田 昌子、高岡 幸、三宅 達也、木村 正
2. 発表標題 当院で慢性子宮内膜炎検査を実施した胚移植不成功患者24例の検討
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------